

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 778 527

②① N° d'enregistrement national :

98 06475

⑤① Int Cl<sup>6</sup> : A 01 H 1/00, C 12 N 15/63

①⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 18.05.98.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 19.11.99 Bulletin 99/46.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : RHONE POULENC AGRO Société  
anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) :

⑤④ NOUVELLE METHODE DE PRODUCTION DE TOCOPHEROLS DANS LES PLANTES ET PLANTES  
OBTENUES.

⑤⑦ La présente invention concerne un procédé de pro-  
duction de tocophérols dans des plantes génétiquement  
modifiées, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver une  
plante génétiquement modifiée appropriée pour effectuer la  
surexpression d'une hydroxyphényl pyruvate dioxygénase  
(HPPD) dans les chloroplastes des cellules végétales des  
dites plantes génétiquement modifiées.

FR 2 778 527 - A1



## Nouvelle méthode de production de tocophérols dans les plantes, et plantes obtenues

La présente invention concerne une nouvelle méthode de production de tocophérols dans les plantes, et les plantes obtenues à forte teneur en tocophérols.

5 La vitamine E et les tocophérols sont des composants essentiels dans les organismes vivants, en particulier végétaux ou animaux, notamment par leurs propriétés antioxydantes. Ils sont d'ailleurs couramment employés en alimentation humaine ou animale, de même qu'en cosmétique.

Il est aujourd'hui connu que le niveau d'expression de tocophérols, en particulier de  
10 vitamine E dans les plantes, peut être modulé et contrôlé en contrôlant l'expression d'une enzyme impliquée dans la biosynthèse des tocophérols, la para hydroxyphényl pyruvate dioxygénase, ci-après HPPD (WO 97/27285).

Cette HPPD se trouve dans de nombreux organismes vivants, unicellulaires, en particulier bactériens, ou pluricellulaires, en particulier dans les plantes où elle est exprimée  
15 dans le cytoplasme cellulaire pour produire de l'homogentisate à partir de l'acide para hydroxyphényl pyruvique (WO 96/38567). Il a d'ailleurs été constaté que les enzymes de plantes étaient des enzymes cytoplasmiques, ne comprenant pas de séquence de type « peptide de transit » susceptibles de conduire à l'expression d'une protéine mature dans les chloroplastes (Garcia I. & al. (1997) *Biochem. J.* 325 :761-769).

20 L'HPPD est par ailleurs la cible de nombreux herbicides, et il a été constaté que sa surexpression dans des plantes génétiquement modifiées par l'intégration dans le génome desdites plantes de gènes codant pour une HPPD sous le contrôle d'éléments de régulation appropriés pour l'expression de ladite HPPD, permettait d'obtenir une tolérance améliorée aux herbicides inhibiteurs de cette enzyme (WO 96/38567).

25 Dans les cellules végétales transformées avec les gènes ci-dessus, il va y avoir une activité HPPD supérieure à celle normalement trouvée dans une cellule végétale du même type non transformée. Cette activité supplémentaire va entraîner la production d'une plus grande quantité d'homogentisate dans la cellule. Cet homogentisate a deux devenir possibles dans une cellule végétale. Il peut soit être dégradé dans le cytoplasme, soit être transporté dans  
30 le chloroplaste pour être utilisé comme précurseur de molécules indispensables au bon fonctionnement de l'appareil chloroplastique. Toutefois, si cette surproduction d'homogentisate a lieu dans le cytoplasme une grande quantité de cet homogentisate

supplémentaire sera dégradé via l'homogénéisateur d'oxygénase, limitant fortement la possibilité d'augmenter de manière substantielle la quantité de tocophérols et de vitamine E produits dans la plante transformée.

Bien que l'enzyme naturelle soit une enzyme cytoplasmique, on a maintenant trouvé  
5 que le fait d'exprimer une HPPD dans les chloroplastes des plantes permettaient d'augmenter substantiellement la teneur en tocophérols et en vitamine E desdites plantes transformées, tant vis à vis des plantes non transformées (HPPD native uniquement) que vis à vis des plantes transformées assurant une surexpression d'HPPD dans le cytoplasme uniquement, décrites dans l'état de la technique (WO 97/27285).

10 La présente invention concerne donc nouveau procédé de production de tocophérols dans des plantes génétiquement modifiées, lequel procédé consiste à cultiver une plante génétiquement modifiée appropriée pour effectuer la surexpression d'une HPPD dans les chloroplastes des cellules végétales des dites plantes génétiquement modifiées.

L'HPPD sureprimée dans les chloroplastes selon l'invention peut être de différentes  
15 origines, notamment d'origine bactérienne ou de plantes, en particulier de *Pseudomonas sp.*, d'*Arabidopsis*, de carotte, de blé, etc. Plusieurs séquences protéiques d'HPPD et les séquences nucléotidiques codant pour lesdites séquences protéiques, les moyens de les isoler sont décrites dans la littérature, notamment dans la demande de brevet WO 96/38567, dont le contenu est incorporé ici par référence. Il peut également s'agir d'HPPD ayant subi au moins  
20 une mutation dans leur région C-terminale, telles que décrites dans la demande de brevet FR 97 14264, dont le contenu est incorporé ici par référence.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, l'HPPD peut être surexprimée dans les chloroplastes par la surexpression dans le cytoplasme d'une protéine de fusion comprenant un peptide de transit lié à l'HPPD à son extrémité N-terminale (peptide de  
25 transit/HPPD).

Les peptides de transit utiles selon l'invention et leurs séquences codantes comprennent tous les peptides de transit de précurseurs cytoplasmiques de protéines ou de polypeptides à localisation plastidiale de plantes, préférentiellement chloroplastiques. Il s'agit notamment du peptide de transit de la petite sous unité de la ribulose-1,5-bisphosphate  
30 carboxylase/oxygénase ou de la protéine de liaison chlorophyllienne a/b décrits avec leurs séquences codantes dans le brevets US 5,728,925, dont le contenu est incorporé ici par référence. Il s'agit également du peptide de transit de l'EPSPS de plante décrit dans le brevet

US 4,940,835, dont le contenu est incorporé ici par référence.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, le peptide de transit est un peptide de transit multiple constitué par un premier peptide de transit un d'un précurseur cytoplasmique d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale, une partie de la

5 partie mature N terminale d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale, puis un deuxième peptide de transit d'un précurseur cytoplasmique d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale. De manière préférentielle, le premier et deuxième peptide de transit sont différents. Par différent, on entend selon l'invention des peptides de transit provenant de précurseurs cytoplasmiques de protéines ou polypeptides à localisation

10 plastidiale différents, ou des peptides de transit provenant de mêmes précurseurs de protéines ou polypeptides, mais de plantes différentes. Les peptides de transit multiples selon l'invention sont notamment décrits dans le brevet US 5,633,448 dont le contenu est incorporé ici par référence. De manière préférentielle, le peptide de transit multiple est le peptide de transit optimisé décrit avec sa séquence codante dans le brevet US 5,633,448, comprenant le

15 peptide de transit de la petite sous unité RuBisCO de tournesol, une séquence de 22 acides aminés de la petite sous unité de la RuBisCO de maïs et le peptide de transit de la petite sous unité de la RuBisCO de maïs. La séquence d'ADN codant pour le peptide de transit optimisé associée à la séquence codant pour une HPPD de *Pseudomonas* est représentée par l'identificateur de séquence n°1 (SEQ ID NO 1), et notamment décrite dans la demande de

20 brevet WO 96/38567. Les gènes chimères comprenant unetelle séquence, les vecteurs de transformation des plantes, les cellules végétales transformées les contenant et les plantes régénérées à partir de ces cellules transformées sont décrits dans la demande de brevet WO 96/38567. Il est entendu que la transformation et la régénération des plantes selon un mode particulier préférentiel dépendra de la plante sélectionnée dans laquelle on souhaite

25 surexprimer l'HPPD dans les chloroplastes. Il est entendu que les techniques de transformation et de régénération des plantes est maintenant bien connue de l'homme du métier. Ces transformations sont effectuées en particulier par l'introduction de particules accélérées enrobées d'ADN dans les cellules végétales, par l'introduction de l'ADN dans les cellules végétales au moyen d'une agitation du milieu contenant les deux en présence

30 d'aiguilles, par les techniques d'électroporation ou encore au moyen de cellules d'Agrobactérium appropriées. Ces techniques sont notamment décrites dans les brevets et demandes de brevet suivants : US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US

5 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253. US 5,405,765, EP 270 615, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

Les plantes génétiquement modifiées appropriées pour effectuer une surexpression de l'HPPD dans les chloroplastes sont en particulier décrites dans la demande de brevet WO 96/38567, dont le contenu est incorporé ici par référence.

10 Selon un autre mode préférentiel de réalisation de l'invention, l'HPPD peut être surexprimée dans les chloroplastes en introduisant dans le génome chloroplastique desdites plantes un gène codant pour une HPPD sous le contrôle d'éléments de régulation fonctionnels dans les chloroplastes. Les techniques d'insertion de gènes dans les chloroplastes, comme les éléments de régulations appropriés à l'expression desdits gènes dans les chloroplastes sont bien connus de l'homme du métier, et notamment décrits dans les brevets et demandes de  
15 brevet suivants : US 5,693,507, US 5,451,513 et WO 97/32977.

Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, les plantes appropriées pour le procédé selon l'invention sont choisies parmi les plantes monocotylédones ou dicotylédones, en particulier potagères ou de grande culture, notamment choisies parmi les tomates, les céréales, les plantes oléagineuses, et plus particulièrement parmi le maïs, le colza,  
20 le soja, le tournesol.

Certaines plantes peuvent être modifiées de manière à avoir une teneur en huiles spécifiques différentes de celle trouvées naturellement dans les plantes, de manière à obtenir des plantes à plus haute valeur ajoutée et à modifier leurs qualités nutritionnelles. Il s'agit notamment de produire des maïs à plus forte teneur en huiles, ou encore des tournesols, des  
25 sojas ou des colzas enrichis en acides gras essentiels à santé humaine ou animale. Ces plantes à teneur en huiles modifiées peuvent être obtenues par des méthodes conventionnelles de croisement et de sélection, ou encore par introduction dans le génome desdites plantes d'un ou plusieurs gènes hétérologues dont l'expression permet de modifier le contenu en huiles tant qualitatif que quantitatif. De telles plantes transformées sont notamment décrites dans les  
30 brevets suivants : US 5,378,758, US 5,434,283, US 5,476,524, US 5,545,821, US 5,602,311, US 5,625,130, US 5,638,637, US 5,668,299 ou US 5,710,366. Les gènes codants pour des protéines susceptibles de modifier le contenu en huiles des plantes, et les plantes transformées

les contenant sont notamment décrits dans les brevets et demandes de brevet suivants : WO 98/06862, WO 98/05758, WO 97/48793, WO 97/16559, JP 9 065 882, WO 97/12047, WO 97/07222, WO 96/31609, WO 96/24674, WO 96/02652, JP 6 090 766, WO 93/11245, WO 91/18985, WO 91/13972, US 5,706,603, US 5,704,160, US 5,689,050, US 5,663,068, US 5,639,790, US 5,614,393, US 5,589,619, US 5,530,186, US 5,512,482, US 5,500,361, US 5,498,544 ou US 5,254,801.

Pour des plantes modifiées de manière à produire des teneurs en huiles à haute valeur ajoutée (tant par la qualité que par la quantité des huiles produites) il est nécessaire de protéger efficacement les huiles produites, en particulier contre leur oxydation qui les rendraient inexploitable et/ou leur ferait perdre toute valeur. Il a été ainsi constaté pour certains maïs modifiés de manière à produire de grandes quantités d'huiles, tels que ceux décrits dans le brevet US 5,704,160, un phénomène d'oxydation accéléré desdites huiles et de rancissement, qui rendaient les grains de ces maïs inexploitable, en particulier pour l'alimentation animale. En augmentant la production de tocophérols et de vitamine E dans de telles plantes modifiées, il est possible de protéger lesdites huiles produites contre les phénomènes d'oxydation.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la plante dans laquelle l'HPPD est surexprimée dans les chloroplastes est une plante à teneur en huiles modifiée telle que décrite ci-dessus.

Le gène codant pour une protéine de fusion peptide de transit/HPPD, ou pour l'expression directe d'HPPD dans les chloroplastes peut être introduit dans les dites plantes soit directement en employant les techniques usuelles du génie génétique, notamment décrites ci-dessus, soit par croisement et sélection avec une plante mère comprenant ledit gène.

Dans le cas de plantes modifiées par les techniques de génie génétique de manière à exprimer une ou plusieurs protéines modifiant son contenu en huiles, tant qualitatif que quantitatif, le ou les gènes codant pour lesdites protéines modifiant le contenu en huiles peuvent être introduits dans le génome de ladite plante simultanément avec le gène codant pour une protéine de fusion peptide de transit/HPPD. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les gènes seront introduits simultanément et associés dans un même vecteur, en particulier un même plasmide, de manière que les gènes soient toujours associés dans le génome de la plante transformée. Dans ce cas, non seulement le gène codant pour la protéine de fusion peptide de transit/HPPD permettra de préserver de l'oxydation les huiles de la plante

obtenue, et donc sa valeur, mais également du fait de ses propriétés de tolérance à certains herbicides décrites dans la demande de brevet WO 96/38567, il facilitera la sélection des plantes à haute valeur ajoutée dans les programmes de sélection des semenciers.

Après culture des dites plantes génétiquement modifiées de manière à surexprimer  
5 HPPD dans les chloroplastes, les tocophérols et la vitamine E peuvent être extraits et purifiés, totalement ou en partie, selon les méthodes usuelles, tant des feuilles que des graines des plantes cultivées. Dans le cas des plantes modifiées de manière à modifier leur teneur en huiles, les tocophérols et la vitamine E peuvent être extraits simultanément avec les huiles des dites plantes cultivées, assurant simultanément la préservation des dites huiles contre les  
10 phénomènes d'oxydation et l'enrichissement des dites huiles avec des molécules à hautes valeur ajoutée essentielles à la santé animale et humaine, et à leur alimentation.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les plantes cultivées ou leurs graines peuvent être employées telles quelles, sans extraction préalable de la vitamine E et des tocophérols comme élément alimentaire, seul ou en mélange destiné à l'alimentation humaine  
15 ou animale.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, sans toutefois en limiter la portée.

#### Exemple 1 : Teneur en vitamine E de tabacs modifiés

Les tabacs modifiés CY et CO décrits dans les exemples 2 à 5 de la demande de brevet  
20 WO 96/38567 ont été cultivés. La teneur en vitamine E dans les feuilles des tabacs cultivés est mesurée après extraction de la vitamine E. Les analyses montrent une teneur en vitamine supérieure pour le tabac CO avec localisation de l'HPPD dans les chloroplastes.

L'analyse a été faite de la manière suivante : extraction qualitative non altérante menée à l'aide d'un système de solvant type hexane :isopropanol 3 :2 (v/v), mais d'autres mélange  
25 sont utilisables. Puis dosage des tocophérols par CLHP selon divers protocoles comme entre autre celui référencé IUPAC 2.432.

#### Exemple 2 : Teneur en vitamine E d'un soja modifié

Des tissus soja, variété Jack et variété Chapman ont été transformés comme suit :

30 Les tissus de soja sont transformés par la technique de bombardement de particules (Finer et Mc Mullen, 1991, In vitro Cell. Dev. Biol. 27P: 175-182.).

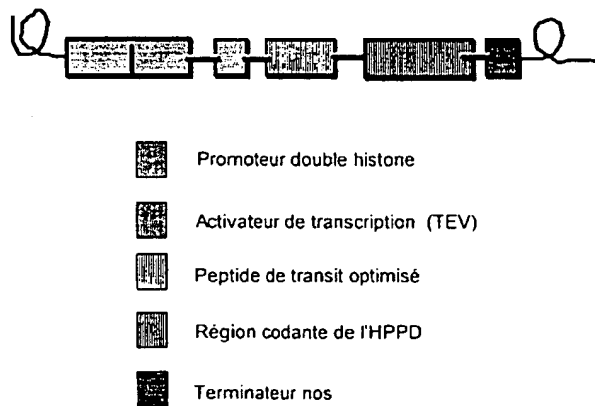
La régénération du soja est obtenue selon le protocole décrit par Finer et Mc Mullen,



1991. Des suspensions embryogènes sont initiées à partir de cotylédons zygotiques immatures; ces suspensions sont rendues compétentes à la transformation par repiquages successifs sur un milieu contenant du 2,4 D. Les tissus de soja sont alors transformés par la technique de bombardement de particules. La sélection des tissus se fait sur un milieu  
 5 contenant l'hygromycine comme agent de sélection à la dose de 30 ppm. La régénération des cals embryogènes en plantes fertiles est obtenue par une conversion des cals en embryons par retrait du 2,4 D. Ces embryons sont ensuite enracinés et mis à germer sur un milieu approprié. Les jeunes plantes sont transférées en serre.

Nous avons obtenu selon ce procédé des sojas Jack et Chapman. Ils comprennent un  
 10 gène codant pour une protéine de fusion OTP/HPPD, décrite par l'identificateur de séquence n° 1, sous le contrôle d'éléments de régulation comprenant un promoteur Double histone et de l'activateur de transcription TEV et un terminateur Nos (construit identique à celle introduite dans les tabacs modifiés CO de l'exemple 1 et représenté schématiquement dans la figure suivante).

#### 15 Représentation schématique du gène de l'OTP/HPPD



Ces sojas modifiés, avec une forte activité HPPD dans les plastides, ont montré une tolérance à de très fortes teneurs en isoxaflutole (herbicide inhibiteur d'HPPD). La teneur en  
 20 vitamine E dans les feuilles et les graines de ces sojas transformés est très nettement supérieure à la teneur en vitamine E des sojas non transformés correspondants.

## LISTE DE SEQUENCES

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 1

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1449 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: OTP
- (B) EMPLACEMENT:1..372

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: HPPD
- (B) EMPLACEMENT:373..1446

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATG GCT TCG ATC TCC TCC TCA GTC GCG ACC GTT AGC CGG ACC GCC CCT	48
Met Ala Ser Ile Ser Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Arg Thr Ala Pro	
1 5 10 15	
GCT CAG GCC AAC ATG GTG GCT CCG TTC ACC GGC CTT AAG TCC AAC GCC	96
Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn Ala	
20 25 30	
GCC TTC CCC ACC ACC AAG AAG GCT AAC GAC TTC TCC ACC CTT CCC AGC	144
Ala Phe Pro Thr Thr Lys Lys Ala Asn Asp Phe Ser Thr Leu Pro Ser	
35 40 45	
AAC GGT GGA AGA GTT CAA TAT ATG CAG GTG TGG CCG GCC TAC GGC AAC	192
Asn Gly Gly Arg Val Gln Tyr Met Gln Val Trp Pro Ala Tyr Gly Asn	
50 55 60	
AAG AAG TTC GAG ACG CTG TCG TAC CTG CCG CCG CTG TCA ATG GCG CCC	240
Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro	
65 70 75 80	
ACC GTG ATG ATG GCC TCG TCG GCC ACC GCC GTC GCT CCG TTC CAG GGG	288
Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro Phe Gln Gly	
85 90 95	
CTC AAG TCC ACC GCC AGC CTC CCC GTC GCC CGC CGC TCC TCC AGA AGC	336
Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser Ser Arg Ser	
100 105 110	
CTC GGC AAC GTC AGC AAC GGC GGA AGG ATC CGG TGC ATG GCA GAT CTA	384
Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Met Ala Asp Leu	
115 120 1	

TAC GAA AAC CCA ATG GGC CTG ATG GGC TTT GAA TTC ATC GAA TTC GCG	432
Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe Ile Glu Phe Ala	
5 10 15 20	
TCG CCG ACG CCG GGT ACC CTG GAG CCG ATC TTC GAG ATC ATG GGC TTC	480
Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu Ile Met Gly Phe	
25 30 35	
ACC AAA GTC GCG ACC CAC CGT TCC AAG AAC GTG CAC CTG TAC CGC CAG	528
Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His Leu Tyr Arg Gln	
40 45 50	
GGC GAG ATC AAC CTG ATC CTC AAC AAC GAG CCC AAC AGC ATC GCC TCC	576
Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn Ser Ile Ala Ser	
55 60 65	
TAC TTT GCG GCC GAA CAC GGC CCG TCG GTG TGC GGC ATG GCG TTC CGC	624
Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly Met Ala Phe Arg	
70 75 80	
GTG AAG GAC TCG CAA AAG GCC TAC AAC CGC GCC CTG GAA CTC GGC GCC	672
Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu Glu Leu Gly Ala	
85 90 95 100	
CAG CCG ATC CAT ATT GAC ACC GGG CCG ATG GAA TTG AAC CTG CCG GCG	720
Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu Asn Leu Pro Ala	
105 110 115	
ATC AAG GGC ATC GGC GGC GCG CCG TTG TAC CTG ATC GAC CGT TTC GGC	768
Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile Asp Arg Phe Gly	
120 125 130	
GAA GGC AGC TCG ATC TAC GAC ATC GAC TTC GTG TAC CTC GAA GGT GTG	816
Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr Leu Glu Gly Val	
135 140 145	
GAG CGC AAT CCG GTC GGT GCA GGT CTC AAA GTC ATC GAC CAC CTG ACC	864
Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile Asp His Leu Thr	
150 155 160	
CAC AAC GTC TAT CGC GGC CGC ATG GTC TAC TGG GCC AAC TTC TAC GAG	912
His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala Asn Phe Tyr Glu	
165 170 175 180	
AAA TTG TTC AAC TTC CGT GAA GCG CGT TAC TTC GAT ATC AAG GGC GAG	960
Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp Ile Lys Gly Glu	
185 190 195	
TAC ACC GGC CTG ACT TCC AAG GCC ATG AGT GCG CCG GAC GGC ATG ATC	1008
Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro Asp Gly Met Ile	
200 205 210	
CGC ATC CCG CTG AAC GAA GAG TCG TCC AAG GGC GCG GGG CAG ATC GAA	1056
Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala Gly Gln Ile Glu	
215 220 225	

GAG TTC CTG ATG CAG TTC AAC GGC GAA GGC ATC CAG CAC GTG GCG TTC Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln His Val Ala Phe 230 235 240	1104
CTC ACC GAC GAC CTG GTC AAG ACC TGG GAC GCG TTG AAG AAA ATC GGC Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu Lys Lys Ile Gly 245 250 255 260	1152
ATG CGC TTC ATG ACC GCG CCG CCA GAC ACT TAT TAC GAA ATG CTC GAA Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr Glu Met Leu Glu 265 270 275	1200
GGC CGC CTG CCT GAC CAC GGC GAG CCG GTG GAT CAA CTG CAG GCA CGC Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln Leu Gln Ala Arg 280 285 290	1248
GGT ATC CTG CTG GAC GGA TCT TCC GTG GAA GGC GAC AAA CGC CTG CTG Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp Lys Arg Leu Leu 295 300 305	1296
CTG CAG ATC TTC TCG GAA ACC CTG ATG GGC CCG GTG TTC TTC GAA TTC Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val Phe Phe Glu Phe 310 315 320	1344
ATC CAG CGC AAG GGC GAC GAT GGG TTT GGC GAG GGC AAC TTC AAG GCG Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Glu Gly Asn Phe Lys Ala 325 330 335 340	1392
CTG TTC GAG TCC ATC GAA CGT GAC CAG GTG CGT CGT GGT GTA TTG ACC Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg Gly Val Leu Thr 345 350 355	1440
GCC GAT TAA Ala Asp	1449

## REVENDICATIONS

1. Procédé de production de tocophérols dans des plantes génétiquement modifiées, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver une plante génétiquement modifiée appropriée pour effectuer la surexpression d'une hydroxyphényl pyruvate dioxygénase (HPPD) dans les chloroplastes des cellules végétales desdites plantes génétiquement modifiées.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'HPPD est surexprimée dans les chloroplastes par la production dans le cytoplasme d'une protéine de fusion comprenant un peptide de transit lié à l'HPPD à son extrémité N-terminale (peptide de transit/HPPD).

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le peptide de transit comprend un peptide de transit d'un précurseur cytoplasmique d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale de plantes, préférentiellement chloroplastiques.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le peptide de transit comprend le peptide de transit de la petite sous unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ou de la protéine de liaison chlorophyllienne a/b ou le peptide de transit de l'EPSPS de plante.

5. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le peptide de transit est un peptide de transit multiple constitué par un premier peptide de transit d'un précurseur cytoplasmique d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale, une partie de la partie mature N terminale d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale, puis un deuxième peptide de transit d'un précurseur cytoplasmique d'une protéine ou d'un polypeptide à localisation plastidiale.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le peptide de transit multiple est le peptide de transit optimisé comprenant le peptide de transit de la petite sous-unité de la RuBisCO de tournesol, une séquence de 22 acides aminés de la petite sous unité de la RuBisCO de maïs et le peptide de transit de la petite sous-unité de la RuBisCO de maïs.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la protéine de fusion peptide de transit/HPPD a la séquence décrite par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1).

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la plante est

choisie parmi les tomates, les céréales, les plantes oléagineuses, et plus particulièrement parmi le maïs, le colza, le soja, le tournesol.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la plante est une plante à teneur en huile modifiée.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les tocophérols sont extraits et purifiés, totalement ou en partie.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que les plantes cultivées ou leurs graines sont employées telles quelles, sans extraction préalable de la vitamine E et des tocophérols comme éléments alimentaires, seuls ou en mélanges destinés à l'alimentation humaine ou animale.

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREINSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLEétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

Documents considérés comme pertinents			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée	Domaines techniques recherchés (INT CL <sup>6</sup> )
Y,D	WO 97 27285 A (UNIV ARIZONA) 31 Juillet 1997 * abrégé ; revendications 1-17 ; figures 1,2 * * page 4, alinéa 2 * * page 7, alinéa 2 – page 15, alinéa 2 * * page 24, alinéa 1 – page 28, alinéa 2 *	1-11	C 12 N
Y,D	WO 96 38567 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE ; SAILLAND ALAIN (FR) ; ROLLAND ANNE (FR) ;) 5 décembre 1996 * abrégé ; revendications 9-22 ; exemples 1-3,6 * * page 1, ligne 1 – page 4, ligne 7 *	1-11	
E	WO 9904021 A (BASF AG) 28 janvier 1999 * abrégé ; revendications 1-24 ; figure 4 * * page 5, ligne 4 – ligne 30 * * page 7, ligne 28 – page 10, ligne 14 * * page 13, ligne 13 – page 16, ligne 32 *	1-4,8-11	
Date : 19 Février 1999		Examineur : Oderwald, H	
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>  X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date ou qu'à une date postérieure D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons  & : membre de la même famille, document correspondant	

## **A novel method of tocopherol production in plants, and the plants thus obtained**

This invention concerns a novel method of tocopherol production in plants, and the plants thus obtained that have high tocopherol content.

Vitamin E and tocopherols are essential components of living organisms, especially plants and animals, and are notable for their antioxidant properties. They are also commonly used in human and animal food, as well as in cosmetics.

It is known that the level of tocopherol expression, especially vitamin E in plants, can be modified and controlled by controlling the expression of an enzyme involved in the biosynthesis of tocopherols, p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, hereafter called HPPD (WO 97/27285).

HPPD is found in numerous living organisms, both monocellular, especially bacteria, and multicellular, especially plants in which it is expressed in the cellular cytoplasm to produce homogentisate from p-hydroxyphenylpyruvic acid (WO 96/3857). It has further been observed that the plant enzymes were cytoplasmic enzymes that did not contain "transit peptide" type sequences that could cause a mature protein to be expressed in the chloroplasts (Garcia I. *et al.* (1977), *Biochem. J.* 325:761-769).

HPPD is also the target of numerous herbicides, and it has been observed that overexpression of HPPD in genetically modified plants, which were modified by integrating genes coding for HPPD into said plants' genome controlled by appropriate regulating elements for said HPPD expression, improved tolerance to herbicides that inhibit this enzyme (WO 96/38567).

In plant cells modified with the above genes, HPPD activity will be greater than that normally seen in a plant cell of the same type that is not modified. Such additional activity will lead to increased production of homogentisate in the cell. This homogentisate can develop in one of two ways in a plant cell. It may either be degraded in the cytoplasm or transported in the chloroplast to be used as a precursor molecule necessary for proper chloroplast function. Although the overproduction of homogentisate occurs in the cytoplasm, a large amount of additional homogentisate will be degraded by means of homogentisate dioxygenase, strongly limiting possibilities for substantially increasing the amount of tocopherol and vitamin E products in the modified plant.

Although the natural enzyme is a cytoplasmic enzyme, it has been discovered that HPPD expression in plant chloroplasts can substantially increase the tocopherol and vitamin E content of said modified plants, in both non-modified plants (native HPPD only) and plants modified with HPPD overexpression only in the cytoplasm, described in the prior art (WO 97/27285).

This invention thus concerns a novel procedure for tocopherol production in genetically modified plants, said procedure consisting of cultivating an appropriate genetically modified plant to cause HPPD overexpression in the plant cell chloroplasts of said genetically modified plants.



The overexpressed HPPD in the chloroplasts per the invention may be of various origins, notably bacterial or plant, and especially *Pseudomonas sp.* of *Arabidopsis*, carrot, wheat, etc. Several HPPD protein sequences and nucleotide sequences coding for said protein sequences, and the means for isolating them, are described in the literature, notably in patent application WO 96/38567, the contents of which is incorporated herein as reference. The HPPD may also have undergone a mutation in the C-terminal region, as described in patent application FR 97 14264, the contents of which is incorporated herein as reference.

In a preferred embodiment of the invention, HPPD can be overexpressed in the chloroplasts by overexpressing a fusion protein that comprises a transit peptide bonded to the HPPD at the N-terminus (transit peptide/HPPD) in the cytoplasm.

Transit peptides and their coding sequences that are useful per the invention include all transit peptides of protein or polypeptide cytoplasmic precursors at plastidial plant sites, preferably chloroplasts. Especially appropriate is the transit peptide of the ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit, or the chlorophyll a/b binding protein that are described, with their coding sequences, in patent US 5,728,925, the contents of which is incorporated as reference. Also appropriate is the EPSPS transit peptide of the plant described in patent US 4,940,835, the contents of which is incorporated herein as reference.

In a preferred embodiment of the invention, the transit peptide is a multiple transit peptide consisting of a first transit peptide one from a cytoplasmic precursor of a protein or polypeptide in a plastid, a portion of the N-terminal mature part of a protein or polypeptide in a plastid, and a second transit peptide from a cytoplasmic precursor of a protein or polypeptide in a plastid. In the preferred mode, the first and second transit peptides are different. By "different" in the invention is meant transit peptides from protein or polypeptide cytoplasmic precursors in different plastids, or transit peptides from the same protein or polypeptide precursors, but from different plants. The multiple transit peptides per the invention are notably described in patent US 5,633,448, the contents of which is incorporated herein as reference. In a preferred mode, the multiple transit peptide is the optimized transit peptide described with its coding sequence in patent US 5,633,448, including the transit peptide of the sunflower RuBisCO small subunit, a sequence of 22 amino acids of the corn RuBisCO small subunit, and the transit peptide of the corn RuBisCO small subunit. The DNA sequence coding for the optimized transit peptide associated with the sequence coding for a *Pseudomonas* HPPD is represented by the sequence identifier number 1 (SEQ ID NO 1), and is notably described in patent application WO 96/38567. Chimeric genes that include such a sequence, plant modification vectors, the modified plant cells containing them, and the plants regenerated from these modified cells are described in patent application WO 96/38567. It is understood that the modification and regeneration of plants in a specific preferred mode will depend on the plant in which you want to overexpress HPPD in the chloroplasts. It is further understood that the modification and regeneration techniques are well known by someone skilled in the art. These modifications are performed especially by "shooting" DNA-coated particles into plant cells, by introducing DNA into plant cells by mixing the medium containing the two using needles, by electroporation techniques, or by using appropriate *Agrobacterium* cells. These techniques are notably described in the following patents and patent applications: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267 159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006,

US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 270 615, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071, and WO 95/06128.

The appropriate genetically modified plants for causing HPPD overexpression in chloroplasts are especially described in patent application WO 96/38567, the contents of which is incorporated herein as reference.

In another preferred embodiment of the invention, HPPD can be overexpressed in the chloroplasts by introducing a gene coding for HPPD into the chloroplastic genome of said plants, under the control of functional regulation elements in the chloroplasts. Techniques for inserting genes into chloroplasts, like the regulation elements appropriate for expressing said genes in the chloroplasts, are well known by someone skilled in the art, and are notably described in the following patents and patent applications: US 5,693,507, US 5,451,513, and WO 97/32977.

In a preferred embodiment of the invention, the plants that are appropriate for the procedure per the invention are either monocotyledon or dicotyledon plants, specifically garden or commercially cultivated plants, especially tomatoes, cereals, oleaginous plants, and more specifically corn, colza, soya, and sunflowers.

Certain plants can be modified so as to have specific oil content that differs from that found naturally in the plants, so that higher added value can be obtained from the plants and their nutritional qualities can be modified. This is especially true of high oil content corn or sunflowers, soya, or colzas enriched with essential fatty acids for humans or animals. These plants with modified oil content can be obtained by conventional methods of cross and selection, or by introducing one or several heterologous genes into the genome of said plants, the expression of which allows both the qualitative and quantitative oil content to be modified. Such modified plants are notably described in the following patents: US 5,378,758, US 5,434,283, US 5,476,524, US 5,545,821, US 5,602,311, US 5,625,130, US 5,638,637, US 5,668,299, or US 5,710,366. The coding genes for proteins that can modify the oil content of plants, and the modified plants containing them, are notably described in the following patents and patent applications: WO 98/06862, WO 98/05758, WO 97/48793, WO 97/16559, JP 9 065 882, WO 97/12047, WO 97/07222, WO 96/31609, WO 96/24674, WO 96/02652, JP 6 090 766, WO 93/11245, WO 91/18985, WO 91/13972, US 5,706,603, US 5,704,160, US 5,689,050, US 5,663,068, US 5,639,790, US 5,614,393, US 5,589,619, US 5,530,186, US 5,512,482, US 5,500,361, US 5,498,544, and US 5,254,801.

In plants that are modified so as to produce higher added value oil content (both in quality and quantity of oils produced), said oils must be effectively protected, especially against oxidation, which renders them unexploitable and/or causes them to lose all value. A phenomenon of accelerated oxidation and rancidity of the oils from certain corn modified to produce large quantities of oil, such as those described in patent US 5,704,160, has been observed, which renders the seeds of this corn inexploitable, especially for animal feed. By increasing tocopherol and vitamin E production in such modified plants, it is possible to protect said oils against oxidation processes.

In a preferred embodiment of the invention, the plant in which HPPD is overexpressed in the chloroplasts is a plant with modified oil content, as described above.

The gene coding for a fusion protein transit peptide/HPPD, or for the direct expression of HPPD in the chloroplasts, can be introduced into said plants either directly, using the usual techniques of genetic engineering described above, or by cross and selection with the parent plant containing said gene.

In the case of plants genetically modified to express one or several proteins that modify its oil content, both qualitative and quantitative, the gene or genes coding for said proteins modifying the oil content can be introduced into the genome of said plant simultaneously with the gene coding for a fusion protein transit peptide/HPPD. In a specific embodiment of the invention, the genes are introduced simultaneously and combined in the same vector, especially the same plasmid, such that the genes are always associated in the genome of the modified plant. In this case, not only will the gene coding for the fusion protein transit peptide/HPPD protect oils obtained from the plant from oxidation, thus preserving the value, but due to its tolerance to certain herbicides described in patent application WO 96/38567, it will facilitate the selection of plants with high added value in seed selection programs.

After the plants that are genetically modified to overexpress HPPD in the chloroplasts are cultivated, tocopherols and vitamin E can be extracted and purified, in whole or in part, using the usual methods, from both the leaves and the seeds of said cultivated plants, simultaneously with oil extraction from said plants, thus preserving said oils against oxidation phenomena and enriching said oils with high added value molecules essential to animal and human health and food.

In one embodiment of the invention, the cultivated plants or their seeds can be used as such, without prior extraction of the vitamin E and tocopherols as a food element, alone or in mixture intended for human or animal consumption.

The following examples will illustrate the invention, without limiting its scope.

#### Example 1: Vitamin E content of modified tobacco

CY and CO modified tobacco described in examples 2 to 5 in patent application WO 96/38567 were cultivated. The vitamin E content of the tobacco leaves was measured after extracting the vitamin E. Analyses showed a higher vitamin content in CO tobacco, with HPPD localized in the chloroplasts.

The analysis was performed as follows: qualitative, non-altering extraction performed with a hexane:isopropanol 3:2 (v/v) type solvent, but other mixtures can be used. Tocopherol assay was performed using HPLC per various protocols, like that referenced in IUPAC 2.432, among others.

#### Example 2: Vitamin E content of modified soya

Soya tissues, Jack and Chapman varieties, were modified as follows:

The soya tissues were modified using the particle bombardment technique (Finer and McMullen, 1991, *In vitro Cell. Dev. Biol.* 27P:175-182.).

Soya regeneration was obtained using the protocol described by Finer and McMullen, 1991. Embryogenic suspensions were started from immature zygotic cotyledons; these suspensions were made competent for transformation using successive reseeding in a medium containing 2,4 D. The soya tissues were then modified by particle bombardment. Tissue selection was performed on a medium containing hygromycin as a selection agent, at a dose of 30 ppm. Embryonic calluses in fertile plants were regenerated by converting the calluses in embryos by extracting the 2,4 D. These embryos were then rooted and set to germinate on an appropriate medium. The young plants were transferred into a greenhouse.

We obtained Jack and Chapman soya using this process. They included a gene coding for a fusion protein OTP/HPPD, described by sequence identifier no. 1, controlled by regulation elements comprising a double histone promoter and TEV transcription activator and a Nos terminus (identical construct to that introduced into the CO modified tobacco in example 1 and represented schematically in the following figure).

Schematic representation of the OTP/HPPD gene  
[diagram]

- [ ] double histone promoter
- [ ] transcription activator (TEV)
- [ ] optimized transit peptide
- [ ] HPPD coding region
- [ ] Nos terminus

These modified soya, with strong HPPD activity in the plasts, demonstrated tolerance to very high isoxaflutole content (HPPD inhibitor herbicide). The vitamin E content of the leaves and seeds of these modified soya was very clearly greater to the vitamin E content of the corresponding non-modified soya.

## SEQUENCE LISTING

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 1

### (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO 1:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
  - (A) LENGTH: 1449 base pairs
  - (B) TYPE: nucleotide
  - (C) NUMBER OF STRANDS: double
  - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: cDNA

- (ix) CHARACTERISTIC:
  - (A) NAME/KEY: OTP
  - (B) LOCATION: 1...372
- (ix) CHARACTERISTIC:
  - (A) NAME/KEY: HPPD
  - (B) LOCATION: 373...1446
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO 1

[sequences]

## CLAIMS

1. A procedure for producing tocopherols in genetically modified plants, consisting of cultivating a plant that is appropriately genetically modified to cause overexpression of a hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) in the chloroplasts of the plant cells of said genetically modified plant.
2. A procedure as in claim 1, wherein the HPPD is overexpressed in the chloroplasts by production of a fusion protein comprising a transit peptide bound to HPPD on its N-terminus (transit peptide/HPPD) in the cytoplasm.
3. A procedure as in claim 2, wherein the transit peptide comprises a transit peptide of a cytoplasmic precursor of a protein or polypeptide at plastidial locations in plants, preferably chloroplasts.
4. A procedure as in claim 3, wherein the transit peptide comprises the transit peptide of the ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit or the chlorophyll a/b binding protein or the EPSPS transit peptide of the plant.
5. A procedure as in claim 2, wherein the transit peptide is a multiple transit peptide composed of a first transit peptide of a cytoplasmic precursor of a protein or polypeptide in a plastid, one part of the mature N terminus part of a protein or polypeptide in a plastid, then a second transit peptide of a cytoplasmic precursor of a protein or polypeptide in a plastid.
6. A procedure as in claim 5, wherein the multiple transit peptide is the optimized transit peptide comprising the transit peptide of the sunflower RuBisCO small subunit, a sequence of 22 amino acids of the corn RuBisCO small subunit, and the transit peptide of the corn RuBisCO small subunit.
7. A procedure as in claim 6, wherein the fusion protein transit peptide/HPPD has the sequence described by sequence identifier no. 1 (SEQ ID NO 1).

8. A procedure as in one of claims 1 to 7, wherein the plant is chosen from among tomatoes, cereals, oleaginous plants, and especially from corn, colza, soya, and sunflowers.
9. A procedure as in one of claims 1 to 8, wherein the plant is a plant with modified oil content.
10. A procedure as in one of claims 1 to 9, wherein the tocopherols are extracted and purified, in whole or in part.
11. A procedure as in one of claims 1 to 10, wherein the cultivated plants or their seeds are used as is, without prior extraction of the vitamin E and tocopherols as food elements, either alone or in combinations intended for human or animal consumption.